



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105944085 A

(43)申请公布日 2016.09.21

(21)申请号 201610413921.X

(22)申请日 2016.06.13

(71)申请人 浙江生创精准医疗科技有限公司
地址 310000 浙江省杭州市下城区沈家路
319号202室

(72)发明人 余艳春

(74)专利代理机构 北京三高永信知识产权代理
有限责任公司 11138

代理人 胡业勤

(51)Int.Cl.

A61K 38/20(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61K 38/18(2006.01)

A61K 38/19(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

IL-6单独或与其他细胞因子联合在治疗肝
纤维化中的用途

(57)摘要

本发明涉及白介素-6(IL-6)单独或与其他
细胞因子联合在治疗肝纤维化中的用途。白介
素-6单独或与其他细胞因子联合能够改善肝纤
维化状况。本发明更好地治愈肝纤维化或为治疗
肝纤维化提供另一种可行的选择,提高患者的预
后或者生活质量。

1. 一种用于治疗肝纤维化的药物,其含有白介素-6,以及任选地,药学上可接受的载体。
2. 根据权利要求1所述的药物,其中所述的药物还含有选自由单核细胞趋化蛋白1、肝细胞生长因子、肿瘤生长相关因子GRO和白介素-8组成的组中的1个、2个、3个或4个。
3. 根据权利要求1或2的药物,其为适于注射、输注或口服的剂型。
4. 根据权利要求2的药物,其中药物的包装形式适于白介素-6和其他活性成分被同时施用或按序先后施用。
5. 白介素-6在制备用于治疗受试者中肝纤维化的药物中的用途。
6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述的药物还含有选自由单核细胞趋化蛋白1、肝细胞生长因子、肿瘤生长相关因子GRO和白介素-8组成的组中的1个、2个、3个或4个。
7. 根据权利要求5或6的用途,其中所述药物为适于注射、输注或口服的剂型。
8. 根据权利要求6的用途,其中药物的包装形式适于白介素-6和其他活性成分被同时施用或按序先后施用。
9. 根据权利要求5所述的用途,其中所述的受试者为哺乳动物,优选为人。
10. 根据权利要求1-4中任一项所述的药物或根据权利要求5-9中任一项所述的用途,其中所述的白介素-6为天然的白介素-6或重组人白介素-6。

IL-6单独或与其他细胞因子联合在治疗肝纤维化中的用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药领域,具体涉及白介素-6(IL-6)单独或与其他细胞因子联合在治疗肝纤维化中的用途。

背景技术

[0002] 肝脏疾病严重影响人类的健康和生活方式,是人类面临的重大传染性疾病之一。每年中国有数以万计的患者死于各类肝病,因其并发症较多且死亡率较高,肝病的治疗引起了全世界的广泛关注和研究。肝病主要包括肝损伤,爆发性肝衰竭,肝纤维化,肝硬化,肝细胞癌,胆汁淤积性肝,自身免疫性肝病,酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝等。肝纤维化是一种应对各种各样急/慢性刺激物(包括酒精,病毒感染,药物,毒素,胆汁和代谢物等)的伤口损伤反应,其是各种各样慢性肝损伤的必经之路和共同结果。伴随着刺激物的持续损伤,导致重新构建肝功能的速率跟不上胶原纤维合成和积累的速率,引起了细胞外基质(ECM, extracellular matrix)的积累,因过度地积累而产生持续的生理和病理变化。这些变化主要包括炎症细胞的募集,肝细胞的坏死,内皮屏障的损伤,肌成纤维细胞的激活和最终疤痕的形成。持续的肝纤维化将破坏正常的肝脏结构,形成许多的肝小结,改变血液循环,最终引发肝硬化甚至演变成肝细胞癌。

[0003] 正常的肝实质包含上皮细胞(肝细胞)和非实质细胞(网状内皮细胞,肝星状细胞和Kupffer细胞)。正常的肝脏结构:血窦从肝细胞中以低密度的基底膜样的基质固定于Disse内,这样可以增加新陈代谢的物质和营养交换。当发生损伤时,肝星状细胞被激活,并分泌大量的ECM,导致隔膜明显增厚。纤维化的肝脏结构:损伤达到一定的程度,ECM大量聚集在Disse内,导致内皮细胞窗孔样结构和肝脏微绒毛损失,而且门静脉血流量和肝细胞新陈代谢交换发生损害,并引起门静脉血压过高。

[0004] 当前治疗肝纤维化最有效的方法是原位肝移植(OLT, orthotopic liver transplantation),但是因肝脏捐献者的严重不足,使得OLT的应用受到了极大的限制,因此新的治疗手段是迫切解决肝脏供体短缺的一种方式。

[0005] 干细胞生物学已经变成了最热门的生物医学研究领域之一。MSCs作为一类主要的成体干细胞,许多的临床前实验和临床试验关注MSCs在疾病方面的研究价值和应用前景。MSCs最初发现于骨髓,随后在许多组织与器官中均发现相似特性的MSCs,包括脂肪,肌肉,结缔组织,脐带血,月经血,子宫内膜,羊膜,脾脏,心,牙齿,肺,胰腺,肝,脑,肾脏和外周血。

[0006] 目前,人们利用MSCs治疗肝纤维化的研究越来越深入,而且临床应用也正在进行中。例如,中国专利申请201010551722.8公开了人脐带间充质干细胞抗肝纤维化注射液及其制备方法,该注射液由10%-50%人血白蛋白原液和49.5%-89.5%的勃脉力A液、0.5%肝素钙组成,其中人血白蛋白原液的浓度为10%,1ml注射液中含有人脐带间充质干细胞 6×10^5 - 7×10^5 个;其制备方法包括:提供间充质干细胞保存液,预冷、备用,该间充质干细胞保存液包括人血白蛋白原液和勃脉力A液、肝素钙;提供人脐带间充质干细胞并将其加入到间充质干细胞保存液中;通过重悬的方式,调整加入到间充质干细胞保存液中的人脐带间

充质干细胞数量为 6×10^5 - 7×10^5 个细胞/1ml。中国专利申请201510024090.2公开了一种用于治疗肝纤维化的干细胞制剂及其制备方法,所述的治疗肝纤维化的干细胞制剂,是由人经血间充质干细胞与趋化因子CXCL8和生理盐水配制而成。

[0007] 但是,人们关于MSCs的易感性有些担忧,因为有研究已经提出MSCs自发地发生恶变。虽然MSCs向恶性转变的风险较低,最近公布的数据表明,人MSCs可能会显示基因组的突变,并表现基因水平的不稳定,在高通道端粒缺失(>170),微卫星不稳定,参与DNA修复基因表达下调和异质性点突变等。虽然人MSC的恶性变换没有在临床试验中报道,也可能是后续跟踪时间相对较短,而肿瘤的发生可能需要较长时间才能出现。

发明内容

[0008] 为了更好地治愈肝纤维化或为治疗肝纤维化提供另一种可行的选择,提高患者的预后或者生活质量,本发明的发明人经过大量、坚持不懈的筛选,发现白介素-6(IL-6)单独或者与其他细胞因子联合能够用于治疗肝纤维化。而且,与其他细胞因子的联合具有显著较优或者协同作用。

[0009] 本发明的一个方面涉及一种用于治疗肝纤维化的药物,其含有白介素-6(IL-6)。任选地,本发明的药物还含有药学上可接受的载体。

[0010] 优选地,本发明的用于治疗肝纤维化的药物还含有其他细胞因子,例如选自由骨保护素(OPG)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、HGF(肝细胞生长因子,hepatocyte growth factor)、GR0(growth-regulated oncogene,肿瘤生长相关因子)和白介素-8(IL-8)的细胞因子组成的组的细胞因子中的1个、2个、3个、4个或5个。

[0011] 本发明的第二方面提供了白介素-6(IL-6)在制备用于治疗肝纤维化的药物中的用途。任选地,用于治疗肝纤维化的药物还含有药学上可接受的载体。优选地,用于治疗肝纤维化的药物还含有其他细胞因子,例如选自由骨保护素(OPG)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、HGF(肝细胞生长因子,hepatocyte growth factor)、GR0(growth-regulated oncogene,肿瘤生长相关因子)和白介素-8(IL-8)的细胞因子组成的组的细胞因子中的1个、2个、3个、4个或5个。

[0012] 本发明的第三方面提供了治疗受试者中肝纤维化的方法,其包括向所述受试者中施用有效量的白介素-6(IL-6)或者将白介素-6(IL-6)联合选自由骨保护素(OPG)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、HGF(肝细胞生长因子,hepatocyte growth factor)、GR0(growth-regulated oncogene,肿瘤生长相关因子)和白介素-8(IL-8)的细胞因子组成的组的细胞因子中的1个、2个、3个、4个或5个施用于所述受试者。

[0013] 对于本发明所述的受试者,其优选为哺乳动物,更优选为人。

[0014] 白介素-6(IL-6)是活化的T细胞和成纤维细胞产生的淋巴因子。IL-6能使B细胞前体成为产生抗体的细胞;和集落刺激因子协同,能促进原始骨髓源细胞的生长和分化,增强自然杀伤细胞的裂解功能。有报道称,IL-6在肺纤维化模型组的高表达与早期炎症有关,可能参与了肺纤维化的形成。也有很多报道称IL-6能够诱导促炎症与促进纤维化。本领域技术人员可以对白介素-6作出任何修饰,前提是所述修饰不负面影响其活性。例如,可以对细胞因子进行修饰或装载在其他载体上,以提高其在体内的半衰期;或者可以与已知的穿透肽连接,以促进本发明化合物的透皮吸收或者越过血脑屏障等。总之,本领域技术人员可对

本发明的所述的细胞因子进行各种修饰以提高递送效率或用于其他目的并保持其活性。这类修饰也是在本发明的范围之内。

[0015] 在本发明中,除各种细胞因子的活性成分外,本发明的方法、用途和产品还可以包含合适的药学上可接受的载体,包括促进活性成分加工成制剂(例如适于注射或输注的制剂)的赋形剂和助剂。

[0016] 适于注射或输注的制剂可包括水性和非水性无菌注射液和水性和非水性无菌混悬剂,所述无菌注射液可任选地包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和能使制剂与目的接收者的血液等压的溶质,所述无菌混悬剂可包括悬浮剂和增稠剂。所述制剂可存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿,并且可以保存在冻结干燥的(冻干)条件,在立即使用前仅需要加入无菌液体载体,例如注射用水。

[0017] 本发明的各种细胞因子活性成分任选地可与固体赋形剂相组合,且任选地磨碎所得到的混合物,并且需要时,在加入合适的助剂后,加工颗粒的混合物,以获得所需剂型。合适的赋形剂特别是填充剂例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;纤维素或淀粉制剂、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。需要时,可以加入崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐例如海藻酸钠。

[0018] 在本发明中,施用各细胞因子的量可为能治疗或者协同治疗受试者中肝纤维化或抑制肝纤维化细胞增殖的任何量,其可以是相当于约0.01-15.0mg白介素-6(IL-6),优选0.2-2.0mg白介素-6(IL-6)和0.01-20.0mg选自由骨保护素(OPG)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、HGF(肝细胞生长因子,hepatocyte growth factor)、GRO(growth-regulated oncogene,肿瘤生长相关因子)和白介素-8(IL-8)的细胞因子组成的组的细胞因子。

[0019] 更优选地,本发明的药物的剂量单位包括约1-4mg白介素-6(IL-6)和0.01-20.0mg选自由骨保护素(OPG)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、HGF(肝细胞生长因子,hepatocyte growth factor)、GRO(growth-regulated oncogene,肿瘤生长相关因子)和白介素-8(IL-8)的细胞因子组成的组的细胞因子。最优选地,剂量单位包括约2-3mg的白介素-6(IL-6)和2.0-6.0mg选自由骨保护素、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、HGF(肝细胞生长因子,hepatocyte growth factor)、GRO(growth-regulated oncogene,肿瘤生长相关因子)和白介素-8(IL-8)的细胞因子组成的组的细胞因子。

[0020] 在本发明中,施用的有效量以及合适的单位剂量的测定在本领域技术人员的能力内,特别是根据本文提供的公开内容的启示下。

[0021] 根据本发明,本发明的药学药物可以以任意有效剂量施用给药受试者。优选地,本发明的药物可以以多次剂量给药,例如从约2至约15次剂量,更优选约4-10次剂量,最优选约6次剂量。在特别优选的实施方案,在给药过程中,以每三周给药约一次的频率将本发明的药物给药至受试者,例如注射、输注或口服。在特别优选的实施方案,给药为通过静脉注射施用。

[0022] 应当理解本发明的药物可以按用于通过任意适宜的途径给药的任意适宜的方式配制。

[0023] 本发明的药物的剂量单位是基于常规进行给药受试者。例如,剂量单位可以基于给药频率为每日一次、每周一次、每月一次等确定。剂量单位也可基于以两次/周、三次/周

等确定。

[0024] 如本文所使用的,“包含”与“包括”、“含有”或“特征在于”同义,并且是包括在内的或开放性的,并且不排除另外的未陈述的元件或方法步骤。术语“包含”在本文中的任何表述,特别是在描述本发明的方法、用途或产品时,应理解为包括基本上由所述组分或元件或步骤组成和由所述组分或元件或步骤组成的那些产品、方法和用途。本文示例性描述的本发明适当地可以在不存在本文未具体公开的任何一种或多种元件、一种或多种限制的情况下进行实践。

[0025] 本发明的药物中可包含涉及该药学产品的说明书,且该说明书可以含有如下内容:适应症(例如肝纤维化)、施用剂量(例如上述所示例性说明的)以及可能产生的副作用等等。

[0026] 本文已采用的术语和表述用作描述性而不是限制性术语,并且在此种术语和表述的使用中不预期排除所示和所述特征或其部分的任何等价物,但应认识到各种修饰在请求保护的本发明的范围内是可能的。因此,应当理解尽管本发明已通过优选实施方案和任选特征具体公开,但本领域技术人员可以采用本文公开的概念的修饰和变化,并且此类修饰和变化被视为在如由附加权利要求定义的本发明的范围内。

[0027] 为更清楚地说明本发明,现结合如下实施例进行详细说明,但这些实施例仅仅是对本发明的示例性描述,并不能解释为对本申请的限制。

附图说明

[0028] 图1:细胞上清和细胞ELISA定量检测MCP-1, IL-6, HGF, GRO, IL-8和OPG。ELISA定量检测LX-2组, MenSC组和共培养组(co-culture组)培养72h后细胞上清液以及细胞的蛋白表达量。(A), 细胞上清液蛋白量。(B), 细胞的蛋白表达量。分析及作图采用GraphPad Prism 5软件。数值代表平均值 \pm SD(n=4)。

具体实施方式

[0029] 本发明结合附图和实施例作进一步的说明。

[0030] 实施例1:肝纤维化小鼠模型的建立及鉴定

[0031] 本发明使用本领域常用的通过CCl₄损伤小鼠肝脏而建立的肝纤维化小鼠模型。

[0032] 将6-8周ICR小鼠(购自上海斯莱克(SLAC)实验动物有限责任公司)腹腔注射CCl₄, 按照1mL CCl₄/kg小鼠体重注射。CCl₄以10%的比例溶解于橄榄油(olive oil)中,用1mL微型注射器(BD Biosciences)每周注射两次并持续注射4周,这样就建立了小鼠的早期肝纤维化模型。通过摘取小鼠肝脏,对其进行sirius red染色,检验肝脏组织病理情况;同时检测小鼠的血清肝功能指标,包括ALT, AST, ALB, ALP和TBIL。通过以上指标,验证小鼠纤维化模型是否构建成功。

[0033] 实施例2:MenSCs的分离和体外培养

[0034] 在经期健康女性自愿者月经周期时,利用Divacup(Kitchener, ON)收集女性经血样品。在获取样品后的2天之内,将样品小心存于4℃。取出这些样品之后,后续操作程序均在细胞房中进行处理。将收集到的经血进行离心(1000rpm, 10min, 4℃),利用Ficoll-Paque分离得到液体中的单核细胞(混合型),随后将细胞样品进行检测,检测上清液中细菌数量,

待各项指标达标后进行细胞体外增殖培养。细胞分离之后用PBS洗涤3-5次(尽可能弃去杂质),然后将分离纯化的细胞转到加有DMEM/F12培养基(添加了1% penicillin/streptomycin、1% amphotericin B和15% FBS)的细胞培养瓶(Corning)中继续贴壁培养。将分离后的细胞培养一周左右,每隔2天换1次液,同时吸弃未能正常贴壁的悬浮细胞/死细胞。随后,每隔3天更换新鲜Chang培养基,选取形态分布均一、生长状态良好的MenSCs进行扩大培养。当细胞密度达到80%左右时,用PBS洗涤3次,而后加入0.25% Trypsin-EDTA(5-10min)进行细胞消化,将消化后的细胞进行离心并按照1:3的比例进行细胞扩大培养(加入新鲜培养基)。所有培养的细胞均放置于37℃恒温和5% CO₂的饱和湿度培养箱(ThermoFisher)中。经过约5代的扩大培养,其形态已经基本趋于稳定和均一,并可以见到细胞呈现典型的梭形并呈旋涡状排列。

[0035] 为了进一步验证MenSCs的特性,利用流式细胞仪对MenSCs进行细胞表面标记分子的鉴定,检测的分子包括CD29,CD34,CD45,CD73,CD90,CD105,CD117和HLA-DR。结果显示MenSCs能够高表达CD29,CD73,CD90和CD105(均>90%),低表达CD45,几乎不表达CD34,CD117和HLA-DR(均<1%)。

[0036] 本文实施例中所使用的MenSCs为第5到第8代次的细胞(P5-P8),除非特别指出。

[0037] 实施例3:表达绿色荧光蛋白(GFP)的MenSCs(GFP+MenSCs)的构建和筛选

[0038] P2-P3的MenSCs培养于T75培养瓶(Corning)中,当细胞贴壁生长到大约50%时吸弃培养基,用PBS洗涤3次,添加含有6μg/mL的polybrene(汉恒生物科技有限公司)以及GFP-PUR0(汉恒生物科技有限公司)病毒液(MOI=50;MOI,multiplicity of infection)的10mLChang氏完全培养基(杭州易文赛生物科技有限公司)。1天后更换新鲜培养基,待细胞培养2-3天后再次更换新鲜培养基,并用2μg/mL的puromycin(Sigma)进行细胞筛选。对筛选后的细胞(GFP+MenSCs)进行GFP阳性检测以及细胞表面标记分子(包括CD29,CD34,CD45,CD73,CD90,CD105,CD117和HLA-DR)的表达与鉴定。

[0039] 取筛选两周后的部分细胞进行鉴定,可以看出,与正常MenSCs相比,GFP⁺MenSCs并没有发生明显的形态变化,而通过GFP荧光直观观察,发现几乎全部的细胞(>99%)已经感染上了慢病毒,这样的结果通过流式细胞进行了进一步确认。

[0040] 为了验证GFP⁺MenSCs的表面标志物是否发生变化,检测了和MenSCs相对应的表面分子。结果显示与正常MenSCs相比,GFP⁺MenSCs并没有发生明显的表面标记分子改变,而且表面标记分子特性和MenSCs一致。这进一步表明Puro-GFP慢病毒对于经血干细胞的形态及表面标记分子并无明显的影响。

[0041] 实施例4:活体成像检测GFP⁺MenSCs移植小鼠后的组织分布

[0042] 为了验证MenSCs具有向肝损伤部位趋化的功能,将稳定筛选的GFP⁺MenSCs移植到小鼠体内,一共分为5个组别:

[0043] (1)正常对照组(normal control):对小鼠不做任何处理;

[0044] (2)GFP⁺MenSCs移植到正常小鼠(normal mice)1周组(命名为GFP⁺1W in NM);

[0045] (3)GFP⁺MenSCs移植到肝纤维化模型小鼠(liver fibrosis mice)1周组(命名为GFP⁺1W in LFM);

[0046] (4)GFP⁺MenSCs移植到正常小鼠2周组(命名为GFP⁺2W in NM);

[0047] (5)GFP⁺MenSCs移植到肝纤维化模型小鼠2周组(命名为GFP⁺2W in LFM)。

[0048] 上述各组别的小鼠均采用麻醉处死,然后利用手术剪刀和眼科镊子将主要的几个器官进行分离,这些脏器包括肝(liver),肺(lung),脾(spleen),肾(kidney)和心(heart)。分离得到的器官用PBS清洗3次(每次3min),这样就能完全的去掉残留的血块和杂质(减少或去除活体成像产生的干扰)。每个组平行处理6只小鼠($n=6$)。这些分离得到的器官在IVIS SPECTRUM小鼠活体成像系统(Caliper Life Sciences)下拍照,并用相关软件(Living Image 4.3.1software)对荧光强度进行统计分析。

[0049] 结果发现,正常对照组几乎不表达GFP蛋白,GFP⁺1W/2W in NM组和GFP⁺1W/2W in LFM组能够在肝脏中表达GFP蛋白。GFP⁺1W/2W in LFM组的荧光强度明显高于对应时间点的GFP⁺1W/2W in NM组。更重要的是,GFP⁺1W/2W in LFM组中大部分MenSCs迁移到了肝脏部位。这些结果显示MenSCs能够定向迁移到损伤部位。此外,荧光强度分析软件进一步确认了该结果。

[0050] 实施例5:肝组织CK-18免疫荧光检测

[0051] 在干细胞移植后的1周和2周,分别取MenSCs组(MenSCs 2W)和GFP⁺MenSCs组(GFP⁺MenSCs 1W和GFP⁺MenSCs 2W)小鼠的肝脏,每个组别有6个样品($n=6$)。将收集的肝组织用锡箔纸包起来,快速冻存于-80℃冰箱。具体的免疫荧光操作步骤如下:

[0052] (1)迅速从-80℃冰箱取出冰冻组织并用Tissue-Tek OCT包埋剂(Sakura)将样品进行包埋;

[0053] (2)将样品放置于冰冻切片机(CryoStar NX50,Thermo)切片,厚度为4-6μm;

[0054] (3)在室温放置30min,然后加入4℃预冷的丙酮(固定样品10min),接着用PBS清洗3次(每次5min);

[0055] (4)阻断内源性过氧化物酶(H₂O₂)酶:加入3%的H₂O₂(约10min),然后用蒸馏水进行水洗3min,之后再用PBS(0.01M PH=7.5)清洗切片三次(每次约5min);

[0056] (5)封闭:用5%的正常山羊血清(用PBS进行稀释),然后在室温孵育20min,接着再用PBS清洗切片三次(每次约5min);

[0057] (6)滴加适当比例稀释的特异性抗人CK-18一抗,4℃孵育过夜,接着再用PBS清洗切片三次(每次约5min);

[0058] (7)滴加适当比例稀释的Cy3标记的羊抗鼠二抗(稀释比例1:400),室温孵育60min;

[0059] (8)用DAPI复染20min以标记细胞核,然后用PBS清洗切片三次(每次约5min);

[0060] (9)封片,用荧光显微镜(U-HGLGPS光源,Olympus)观察并拍照。

[0061] 结果发现,MenSCs 2W组几乎不表达GFP;相比于MenSCs 2W组,GFP⁺MenSCs组能够明显的表达GFP,并且GFP⁺MenSCs 2W的荧光强度高于GFP⁺MenSCs 1W组。400倍放大的图片更加清晰的展示了这一结果(图略)。这些进一步验证了MenSCs具有向损伤部位趋化的作用。特异性抗人CK-18的表达用于检测MenSCs移植到小鼠肝脏后,MenSCs是否有部分细胞分化成肝样细胞。结果表明,MenSCs并未分化成肝样细胞。

[0062] 实施例6:移植经血干细胞改善小鼠的肝纤维化

[0063] 实施例6.1:小鼠尾静脉移植

[0064] 使细胞浓度为 5×10^6 /mL,用1mL微型注射器通过尾静脉注射到已经构建好的纤维化模型小鼠中(每只小鼠移植约 5×10^5 细胞/100μL)。将GFP⁺MenSCs/MenSCs移植到肝纤维化

模型小鼠命名为GFP⁺MenSCs组/MenSCs组,同时将只注射等量PBS的肝纤维化模型小鼠命名为PBS组。为了防止发生小鼠纤维化自发性恢复的情况,在干细胞移植的两周中,小鼠持续注射CCl₄。

[0065] 实施例6.2:SR染色

[0066] 在干细胞移植到小鼠后的第1周和第2周,分别麻醉并脱颈处死小鼠,分别取MenSCs组(MenSCs 1W和MenSCs 2W)和PBS组(PBS 1W和PBS 2W)小鼠的肝脏,每个组别有6个样品(n=6)。具体的组织处理步骤如下:

[0067] (1)固定:组织加入到10%的中性福尔马林中,固定大概1天;

[0068] (2)脱水:取出固定好的组织,将其依次放入梯度酒精进行脱水(分别是70%酒精1h,80%酒精1h,95%酒精1h和100%酒精1h);

[0069] (3)透明:先用二甲苯I浸泡10min,然后用二甲苯II浸泡20min;

[0070] (4)浸蜡:先用软蜡在60℃下1h,然后用硬蜡在60℃下2h;

[0071] (5)包埋:硬蜡包埋;

[0072] (6)切片:在石蜡切片机(HM325型轮转式)上进行组织切片,切片的厚度大概为5μm;

[0073] (7)烤片:在60℃条件下,烤约4h。

[0074] 将干燥的石蜡切片放置于二甲苯中,依次在梯度酒精中(100%酒精3min,95%酒精3min,80%酒精3min,70%酒精3min)进行脱蜡处理。用事先配好的0.1%SR(0.1g SR溶于100mL picric acid中)进行孵育30min,使用蒸馏水冲洗1-2次,使用梯度酒精脱水,中性树脂进行封片,利用显微镜(Olympus IX83)进行图像采集。利用IPP 6software(Image Pro Plus 6,Media Cybernetics)分析胶原纤维面积(胶原面积/总的面积)。

[0075] MenSCs移植到纤维化小鼠1周和2周后,观察并检测胶原纤维面积。结果表明,尽管MenSCs 1W组(1.9%)的胶原积累面积低于PBS 1W组(2.4%),但其在统计学上并没有显著性差异;相反,MenSCs 2W组(2.2%)的胶原纤维面积相比于PBS 2W组(3.4%)有明显减少,说明肝纤维化在MenSCs移植2周后病理指标上得到了改善。

[0076] 实施例6.3:小鼠血清肝功能指标检测

[0077] 在干细胞移植到小鼠后的第1周和第2周,分别麻醉并脱颈处死小鼠,分别收集MenSCs组(MenSCs 1W和MenSCs 2W)和PBS组(PBS 1W和PBS 2W)小鼠的血清,每个组别有6个样品(n=6)。具体的血清收集步骤如下:

[0078] (1)将麻醉的小鼠平稳放置实验台上,使用眼科手术镊子进行小鼠眼球取血,倾斜小鼠,让其血液自然流出,放入到1.5mL的EP管中;

[0079] (2)将倾斜管壁,常温放置90min;

[0080] (3)轻柔操作,放入离心机中离心:4℃,4000rpm,15min;

[0081] (4)用100μL枪头缓慢吸取上清液(注意不要碰到下层的血块);

[0082] (5)将上清液冰浴2min,然后-20℃冻存备用;

[0083] 利用南京建成试剂盒,检验血清学中肝功能常见指标(ALT,AST,ALB,ALP和TBIL)。

[0084] MenSCs细胞移植到纤维化小鼠1周和2周后,分别取样检测血清ALT,AST,ALB,ALP和TBIL(表1)。结果表明,除了ALT之外,MenSCs 1W组(相比于PBS 1W组)的血清学指标并没有显著性差异;相反,MenSCs2W组(相比于PBS 2W组)的血清学指标有较显著的降低(ALB除

外),说明肝纤维化在生理指标上得到了改善。

[0085] 表1小鼠常见肝功能血清指标检测

[0086]

	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)	ALP(U/L)	TBIL(μ mol/L)
实验模型					
橄榄油	42 \pm 17	59 \pm 18	35 \pm 2	48 \pm 10	6 \pm 1
CCl ₄	183 \pm 30**	207 \pm 47 **	30 \pm 3 **	92 \pm 12 **	10 \pm 1 **
细胞移植					
PBS 1W	267 \pm 36	299 \pm 45	29 \pm 2	111 \pm 8	11 \pm 1
MenSCs 1W	202 \pm 31 *	247 \pm 27	30 \pm 3	103 \pm 18	11 \pm 2
PBS 2W	349 \pm 63	351 \pm 54	28 \pm 2	134 \pm 16	14 \pm 2
MenSCs 2W	234 \pm 30 *	274 \pm 38 *	30 \pm 3	108 \pm 13 *	12 \pm 1 *

[0087] 注:ALT,丙氨酸氨基转移酶;AST,天冬氨酸氨基转移酶;ALB,白蛋白;ALP,碱性磷酸酶;TBIL,总胆红素。“*”代表P<0.05,“**”代表P<0.01。

[0088] 实施例6.4:HSCs活化指标及促纤维化因子检测

[0089] 实施例6.4.1:qRT-PCR检测HSCs活化相关基因表达

[0090] 实时荧光定量PCR(Quantitative real-time PCR,qRT-PCR)技术检测MenSCs移植后肝脏中HSCs活化相关标志基因 α -SMA和促纤维化因子TGF- β 1的表达变化。

[0091] 在 α -SMA表达中,肝纤维化模型组的表达量(6.6倍,相对于注射了橄榄油的正常小鼠组,下同)相比于注射了橄榄油的正常小鼠组有极显著上升;将MenSCs移植至肝纤维化小鼠模型后一周(7.1倍)的表达量相比于将PBS移植至肝纤维化小鼠模型后1周的PBS 1W组(8.1倍)有显著下降趋势,同样,将MenSCs移植至肝纤维化小鼠模型后2周的MenSCs2W组(9.1倍)的表达量相比于将PBS移植至肝纤维化小鼠模型后2周的PBS 2W组(12.3倍)也有显著下调趋势。类似地,在TGF- β 1表达中,肝纤维化模型组的表达量(2.2倍)相比于注射了橄榄油的正常小鼠组有极显著上升;将MenSCs移植至肝纤维化小鼠模型后1周的MenSCs 1W组和将PBS移植至肝纤维化小鼠模型后1周的PBS 1W组的表达并没有显著性差异,然而,将MenSCs移植至肝纤维化小鼠模型后两周后(4.6倍)的表达相比于将PBS移植至肝纤维化小鼠模型后2周的PBS 2W组(3倍)有显著的下调。

[0092] 实施例6.4.2:免疫组织化学检测 α -SMA和TGF- β 1的蛋白表达水平

[0093] 在经血干细胞移植到小鼠后的第1周和第2周,分别麻醉并脱颈处死小鼠,分别取MenSCs组(MenSCs 1W和MenSCs 2W)和PBS组(PBS 1W和PBS 2W)小鼠的肝脏,每个组别有6个样品(n=6)。将肝脏组织制作成干燥的石蜡切片(参照2.1.3.3.2.2),利用EnVision(Dako)二步法来检测 α -SMA和TGF- β 1的表达情况。免疫组织化学具体的操作步骤如下:

[0094] (1)脱蜡:先用二甲苯I浸泡10min,然后用二甲苯II浸泡10min;

[0095] (2)将干燥的石蜡切片放置于二甲苯中,依次在梯度酒精中(100%酒精3min,95%酒精3min,80%酒精3min,70%酒精3min)进行脱蜡处理,然后水洗2min;

[0096] (3)抗原修复:切片放入到已经预热好的0.01M(mol/L)柠檬酸缓冲液(PH=6.0)中,将其煮沸(约20min),然后取出切片让其自然的冷却;

[0097] (4)阻断内源性过氧化氢(H₂O₂)酶:加入3%的H₂O₂(约10min),然后用蒸馏水进行水洗3min,之后再用PBS(0.01M PH=7.5)清洗切片三次(每次约5min);

[0098] (5)滴加 α -SMA和TGF- β 1一抗,工作浓度为1:100,将切片放置在湿盒中,于4℃冰箱内孵育过夜;

[0099] (6)PBS清洗切片三次(每次约5min),然后滴加HRP共轭的抗鼠或抗兔IgG二抗(EnVision工作液),将其放置于室温30min;

[0100] (7)PBS清洗切片三次(每次约5min),然后加入DAB显色液孵育20min;

[0101] (8)蒸馏水洗,终止显色;

[0102] (9)用Harris苏木精来复染切片30s,然后用蒸馏水清洗切片(约10min,是为了进行兰化);

[0103] (10)依次在梯度酒精中(100%酒精3min,95%酒精3min,80%酒精3min,70%酒精3min)处理,然后用二甲苯透明,接着用中性树脂进行封片;

[0104] (11)晾干,在显微镜(IX83,Olympus)下观察并拍照。

[0105] 分别收集四个组(CCl₄组,Vehicle组,MenSCs组和PBS组)小鼠的肝组织,利用免疫组化检测 α -SMA和TGF- β 1的蛋白表达情况。纤维化模型组命名为CCl₄组;将只注射橄榄油的正常组小鼠命名为Vehicle组;将MenSCs移植到肝纤维化模型小鼠命名为MenSCs组;以及将PBS注射到肝纤维化模型小鼠命名为PBS组。在Vehicle组中 α -SMA的表达仅限于血管平滑肌细胞和中央静脉周围;而在CCl₄组中 α -SMA能够表达于窦周间隙,表明HSCs被激活了。MenSCs移植到纤维化小鼠1周和2周后,MenSCs 1W组(相比于PBS 1W组)和MenSCs 2W组(相比于PBS 2W组)的 α -SMA表达明显受到了抑制,说明MenSCs移植能够降低HSCs的激活。类似地,在Vehicle组中TGF- β 1表达于细胞浆中且几乎全部表达,而在CCl₄组中TGF- β 1的表达也是全部表达于所有细胞中,但是其表达量明显增强。MenSCs移植到纤维化小鼠1周和2周后,MenSCs 1W组的TGF- β 1表达与PBS 1W组相比,并没有显著性差异,而MenSCs 2W组(相比于PBS 2W组)的TGF- β 1表达强度明显减弱。

[0106] 实施例6.4.3:Western blot检测 α -SMA的蛋白表达

[0107] 麻醉处死小鼠后,分别收集四个组(CCl₄组,Vehicle组,MenSCs组和PBS组,各组的命名同实施例6.4.2)小鼠的肝脏组织,取米粒大小的肝脏,用小型匀浆器破碎组织。首先加入500 μ L的蛋白裂解液(按照比例RIPA裂解液:PMSF=100:1进行配制),然后在冰上进行裂解(约60min),接着4℃离心(12000rpm,5min),将离心所得的上清液转移到1.5mL的EP管中。利用BCA试剂盒测定肝组织样品的蛋白浓度,做好记录并保存于-80℃冰箱备用。

[0108] 每个组别取20 μ g蛋白上清液,westernblot实验检测 α -SMA蛋白表达。具体步骤如下:

[0109] (1)蛋白上清液按照1:4的比例混合于4 \times loadingbuffer(Life Technologies)中,将混合后的样品放入到98℃金属加热仪(加热5min),使样品中的蛋白质得到充分的变性;

[0110] (2)把10%预制胶(LifeTechnologies)放入电泳槽中,将样品加入新鲜的电泳缓冲液(LifeTechnologies)中跑胶,以电压为120V的强度进行电泳(大约70min,以蓝色指示

剂到达预制胶3/4处为宜);

[0111] (3)用专门的切胶器进行切胶,然后依次铺上三层海绵,四层过滤滤纸,切下来的凝胶,PVDF膜(Millipore),四层过滤滤纸,三层海绵,随后将配制好的转膜缓冲液倒入westernblot电泳槽(Life Technologies)中,接着将其转入4℃冰箱中且以恒定的电流(200mA)进行转膜1h;

[0112] (4)用0.5%的BSA溶液(生工生物科技有限公司),并放置于摇床上室温平摇封闭1h左右;

[0113] (5)用TBST洗膜2次(每次洗膜约10min,置于摇床上进行),然后加入一抗于4℃孵育过夜;

[0114] (6)一抗回收,用TBST洗膜3次(每次洗膜约10min,置于摇床上进行);

[0115] (7)加入相应的二抗,然后在室温下放置于摇床中孵育1h;

[0116] (8)用TBST洗膜3次(每次洗膜约10min,置于摇床上进行),加入ECL化学发光液(Bio-Rad),在全自动凝胶成像系统(Tanon-4500智能转换型)下进行扫膜并拍照。

[0117] 其中,转膜缓冲液的配方:甘氨酸为2.9g,Tris为5.8g,SDS为0.37g,甲醇200mL,加ddH₂O定容至1000mL;TBST的配方:Tris-base为24.4g和NaCl为80g,用浓HCl调整PH至7.4(PH指示剂),然后加0.05%的Tween 20(Sigma)。

[0118] 结果表明,Vehicle组几乎不表达 α -SMA,CCl₄组的表达量呈显著上升;MenSCs 1W组的蛋白表达量相比于PBS 1W组有显著下降趋势,同样地,MenSCs 2W组的蛋白表达量相比于PBS 2W组也有显著下调趋势。

[0119] 为了进一步调查经血干细胞是如何改善肝纤维化,本发明的发明人进行了一下实施例。

[0120] 实施例7:MenSCs和LX-2细胞Transwell模型的建立

[0121] 为了研究MenSCs对LX-2细胞的影响,利用Transwell小室(滤膜直径:24mm,滤膜孔径:0.4 μ m;Crning),将本研究分为3个组别,即LX-2组(n=4), 2×10^5 /well的LX-2细胞铺于Transwell小室的下层;MenSC组(n=4), 2×10^5 /well的MenSCs铺于Transwell小室的上层;共培养组(co-culture组)(n=4), 2×10^5 /well的LX-2细胞铺于Transwell小室的下层并且 2×10^5 /well的MenSCs铺于Transwell小室的上层。每个小室均加3mL的DMEM培养基(10% FBS)。

[0122] 实施例8:MenSCs对LX-2细胞增殖的影响

[0123] 为了研究MenSCs对LX-2细胞增殖的影响,采CCK-8(Dojindo)试剂盒检测LX-2组和共培养组(co-culture组)中LX-2细胞增殖情况,具体的实验步骤如下:

[0124] (1)LX-2组(n=4)和共培养组(co-culture组)(n=4)共培养24h,48h和72h;

[0125] (2)按照说明书,分别向其底层加入一定量的CCK-8试剂(同时设定空白对照组);

[0126] (3)将培养板在培养箱内孵育2h(视情况1-3h);

[0127] (4)用多功能酶标仪(SpectraMax M5,Molecular Devices)测定在450nm处的OD值;

[0128] (5)计算,将所得到的OD值减去相应的空白对照。所得结果即为该组别的OD₄₅₀。

[0129] 2.2.4.1MenSCs抑制LX-2细胞增殖

[0130] 在共培养实验进行之前,验证了LX-2细胞。通过细胞免疫荧光染色技术,发现LX-2

细胞几乎全部表达 α -SMA(>95%),同时放大400倍后发现细胞生长状态良好,基本骨架清晰正常。说明LX-2细胞已经处于激活状态,能够作为后续的共培养实验。

[0131] 在共培养实验中,观测了LX-2组和共培养组(co-culture组)在共培养24h,48h和72h之后,LX-2细胞的细胞形态和数目。发现,虽然在细胞培养24h后,LX-2组和共培养组(co-culture组)中的LX-2细胞数目差异不显著;在细胞共培养48h和72h后,共培养组(co-culture组)中的LX-2细胞的数目明显少于LX-2组。更进一步,用CCK-8实验检测并验证了LX-2细胞增殖情况,发现48h和72h的共培养后,共培养组(co-culture组)中的OD值明显低于LX-2组,也就是说共培养使得LX-2细胞的生长和增殖明显受到抑制。

[0132] 实施例9:MenSCs对LX-2细胞周期的影响

[0133] 为了研究MenSCs对LX-2细胞周期的影响,利用细胞周期试剂盒(Sigma)检测LX-2组和共培养组(co-culture组)中LX-2细胞培养48h和72h的细胞周期情况。具体的细胞周期实验步骤如下:

[0134] (1)LX-2组(n=4)和共培养组(co-culture组)(n=4)共培养48h和72h;

[0135] (2)将细胞消化于15mL离心管中,用70%预冷的乙醇固定,随后室温沉淀细胞(1000rpm,5min),去上清;

[0136] (3)加1mL冷PBS重悬细胞,随后沉淀细胞(1000rpm,5min),倒掉PBS;

[0137] (4)配制PI染色液,按照下列比例配制,包括缓冲液(475 μ L),20 \times PI染色液(25 μ L)和50 \times RNAase A(10 μ L);

[0138] (5)每管细胞加入500 μ L的PI染色液,然后缓慢并充分地重悬细胞;

[0139] (6)37 $^{\circ}$ C避光孵育30min,然后用300目的细胞筛过滤细胞,利用流式细胞仪(Beckman)检测细胞周期。

[0140] 通过流式细胞术检测了LX-2组和共培养组(co-culture组)中LX-2细胞48h和72h的细胞周期情况。共培养48h后,LX-2组和共培养组(co-culture组)中的LX-2细胞G0/G1期,S期和G2/M期分别是47 \pm 2%(G0/G1),35 \pm 3%(S),18 \pm 1%(G2/M)和62 \pm 3%(G0/G1),23 \pm 2%(S),15 \pm 1%(G2/M)。类似地,共培养72h后,LX-2组和共培养组(co-culture组)中的LX-2细胞G0/G1期,S期,G2/M期分别是71 \pm 3%(G0/G1),15 \pm 2%(S),14 \pm 1%(G2/M)和83 \pm 3%(G0/G1),8 \pm 2%(S),9 \pm 1%(G2/M)。也就是说在48h和72h时,共培养组(co-culture组)中,处于G0/G1期的LX-2细胞显著高于LX-2组。说明MenSCs能够将LX-2细胞阻滞于G0/G1期,并能抑制其增殖。

[0141] 实施例10:抗体芯片检测细胞上清液的蛋白表达

[0142] 为了进一步探究MenSCs分泌哪些因子来对LX-2细胞增殖产生抑制效应,利用人细胞因子G1000芯片(AAH-CYT-G1000,RayBiotech)来检测LX-2组,MenSC组和共培养组(co-culture组)培养72h后120个细胞因子的上清。细胞上清采用上下层培养液混合后统一收集的方式。具体的实验步骤如下:

[0143] (1)将新的玻片芯片(保存于-20 $^{\circ}$ C)从盒子中取出来,在室温下平衡30min,然后将芯片放置于干燥器中2h,以保证芯片完全干燥;

[0144] (2)每个芯片孔中加入100 μ L的1 \times 封闭液,然后在室温摇床上孵育30min(主要是为了避免产生气泡而影响实验结果);

[0145] (3)将封闭液倒掉,在每个孔中添加100 μ L细胞上清样品(LX-2组,MenSC组和共培

养组(co-culture组),n=4),一个阵列加入一个样品(n=4),将芯片平稳放置并于4℃孵育过夜;

[0146] (4)使用Thermo Scientific Wellwash Versa芯片洗板机清洗玻片;

[0147] (5)配制生物素标记的抗体,然后快速离心标记有生物素抗体的小管,每个小管中加入300μL的1×封闭液,混合均匀后再每孔加入70μL的生物素标记抗体;

[0148] (6)每孔加入等量的(70μL)荧光剂-链霉亲和素(1500倍稀释比例),然后快速离心并加入1.5mL的封闭液到小管中,接着用密封条将玻璃芯片贴住,然后再用铝箔纸包住玻璃芯片并在避光条件下室温孵育2h;

[0149] (7)荧光检测:采用激光扫描仪(GenePix 4000B Microarray Scanner)扫描信号,采用数据分析软件对因子进行相关的数据分析(具体筛选因子的条件:共培养组(co-culture组)与LX-2组/MenSC组均有显著性差异,荧光强度值不低于300)。

[0150] 2.2.4.3抗体芯片检测差异表达的因子

[0151] 结果发现,MCP-1,IL-6,HGF,GRO,IL-8和OPG高表达于共培养组(co-culture组)(相比较LX-2组和MenSC组)。此外,对所有差异表达的因子(详见表2)进行了热图分析。进一步确信MCP-1,IL-6,HGF,GRO,IL-8和OPG是这些差异因子中更为显著的。这些因子中,MCP-1和IL-6的上升倍数最显著,其次是HGF,GRO和IL-8。有趣的是,OPG因子在MenSC组和共培养组(co-culture组)均能高表达,而在LX-2组几乎不表达。

[0152] 表2差异表达的因子和编号

蛋白质名称	基因 ID	蛋白质名称	基因 ID	蛋白质名称	基因 ID
血管生成素	283	Leptin	3952	HGF	3082
CCL26	10344	MCP-1	6347	IGFBP-6	3489
FIt-3 配体	2322	MCP-2	6355	IL-11	3589
CSF2	1437	MIG	4283	IL-8	3576
IGFBP-1	3484	PARC	6362	MIF	4282
IGFBP-2	3485	RANTES	6352	OPG	4982
[0153] IL-10	3586	TGF- β 1	7040	sgp130	3572
IL-13	3596	血管生成素-2	285	sTNF-RI	7132
IL-1 α	3552	BTC	685	TECK	6370
IL-1ra	3557	EGF-R	1956	TIMP-1	7076
IL-2	3558	GITR-配体	8995	TIMP-2	7077
IL-5	3567	GRO/GRO- α	2919	TRAIL-R3	8794
IL-6	3569	HCC-4	6360	uPAR	5329

[0154] 实施例11:ELISA检测细胞上清液以及细胞裂解液的蛋白表达

[0155] 为了进一步验证这些抗体芯片中得到的差异较明显的因子(MCP-1, IL-6, HGF, GRO, IL-8和OPG),利用ELISA试剂盒(RayBiotech),定量检测LX-2组, MenSC组和共培养组(co-culture组)培养72h后细胞上清液以及细胞的蛋白表达量。细胞的测定是通过细胞裂解液(CST)来收集并检测,其中的共培养-LX-2代表共培养组(co-culture组)中下层的LX-2细胞;共培养-MenSC代表共培养组(co-culture组)中上层的MenSCs。具体的ELISA实验步骤如下:

[0156] (1)将芯片放置在试剂盒以及样品平衡至室温(18-25℃),所有标准品以及样品使用单孔检测;

[0157] (2)将已经包被抗体的ELISA板放置于室温下平衡30min,随后在对应的孔中加入100μL配制好的标准品(Raybiotech)及样品(细胞上清或细胞裂解液),接着用封板膜封住板条并于4℃孵育过夜;

[0158] (3)将配制好的1×洗液放置于洗板机上,用洗板机来清洗板条(清洗4次,每次10min),随后在每个芯片孔中加入300μL的洗液;

[0159] (4)将洗板清洗干净后,再在每个芯片孔中加入100μL配制好的检测抗体(用生物素抗体进行标记)并于室温下孵育1h;

[0160] (5)每个芯片孔中加入100μL配制好的HRP-链霉亲和素并于室温下孵育45min,然后继续清洗板条步骤同(3);

[0161] (6)加入100μL TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)显色液到每个芯片孔中并于室温下避光孵育30min;

[0162] (7)加入50μL终止液到每个芯片孔中,然后用多功能酶标仪(Molecular Devices)测定在450nm处的OD值,采用Sigmaplot 12.0软件来计算样品中的蛋白浓度值。

[0163] 为了进一步验证这些抗体芯片中得到的差异较明显的因子(MCP-1, IL-6, HGF, GRO, IL-8和OPG),利用ELISA定量检测LX-2组, MenSC组和共培养组(co-culture组)培养72h后细胞上清液以及细胞的蛋白表达量。在细胞上清的结果中,其表达量虽然和抗体芯片不一致,但是其趋势和抗体芯片一致,进一步确认MCP-1, IL-6, HGF, GRO, IL-8和OPG因子的重要作用(图1A)。

[0164] 此外,为了确认这些因子中的主要分泌者是MenSCs还是LX-2细胞,使用细胞ELISA来进一步验证。三个组别的细胞(LX-2组, LX-2细胞;共培养组(co-culture组),共培养-LX-2和共培养-MenSC; MenSC组, MenSCs)用细胞裂解液进行裂解,然后进行ELISA检测。从结果可知(图1B),共培养-MenSC组相比于单一的MenSC组:MCP-1(361±33vs. 29±5pg/mg; 12倍), IL-6(967±104vs. 90±23pg/mg; 11倍), HGF(927±204vs. 176±48pg/mg; 5倍), GRO(432±96vs. 224±69pg/mg; 2倍), IL-8(1033±163vs. 403±75pg/mg; 3倍)和OPG(1338±270vs. 510±103pg/mg; 3倍)。类似地,共培养-LX-2组相比于单一的LX-2组:GRO(94±25vs. 12±6pg/mg; 8倍)和IL-8(165±46vs. 24±9pg/mg; 7倍),而剩下的MCP-1, IL-6, HGF和OPG无显著性差异。

[0165] 实施例12:白介素-6(IL-6)改善小鼠的肝纤维化

[0166] 如实施例6.1和6.2所示,以1mg/Kg的剂量通过尾静脉注射重组人白介素-6(IL-6)(R&D Systems公司)到已经构建好的纤维化模型小鼠中(白介素-6(IL-6)组),对照为只注射等量PBS的肝纤维化模型小鼠(PBS组)。在注射后的第1周和第2周,处死小鼠并进行SR染色,观察并检测胶原纤维面积。结果表明,尽管在第1周白介素-6(IL-6)组(1.9%)的胶原积累面积低于PBS组(2.4%),但其在统计学上并没有显著性差异;相反,在第2周白介素-6(IL-6)组(1.4%)的胶原纤维面积相比于PBS组(3.4%)有明显减少,说明肝纤维化在白介素-6(IL-6)的作用下,其状况得到了显著改善。

[0167] 与此同时,发明人按照实施例6.4进行了免疫组织化学检测α-SMA和TGF-β1的蛋白表达水平,结果发现,注射白介素-6(IL-6)到纤维化小鼠1周和2周后,相对于PBS组而言白

介素-6(IL-6)组的 α -SMA和TGF- β 1的表达明显受到了抑制。这进一步验证了白介素-6(IL-6)在改善或治疗肝纤维化方面的作用。

[0168] 实施例13:白介素-6(IL-6)和骨保护素(OPG)的组合改善小鼠的肝纤维化

[0169] 如实施例6.1和6.2所示,分别以1mg/Kg和5mg/Kg的剂量通过尾静脉注射重组人白介素-6(IL-6)(R&D Systems公司)和重组人骨保护素(R&D Systems公司)到已经构建好的纤维化模型小鼠中(联合组),对照为注射等量重组人白介素-6(IL-6)和与重组人骨保护素等量的PBS的肝纤维化模型小鼠(对照组)。在注射后的第1周和第2周,处死小鼠并进行SR染色,观察并检测胶原纤维面积。结果表明,在第1周联合组(1.5%)的胶原积累面积显著低于对照组(2.0%),在第2周联合组(0.9%)的胶原纤维面积相比于对照组(1.3%)有明显减少,说明肝纤维化在白介素-6(IL-6)和骨保护素(OPG)联合作用下肝纤维化状况得到了更显著改善。

[0170] 与此同时,发明人按照实施例6.4进行了免疫组织化学检测 α -SMA和TGF- β 1的蛋白表达水平,结果发现,联合组相对于对照组而言 α -SMA和TGF- β 1的表达受到了更明显的抑制。这进一步验证了白介素-6(IL-6)和骨保护素(OPG)的组合在改善或治疗肝纤维化方面的更加优异的作用。

[0171] 实施例14:白介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)的组合改善小鼠的肝纤维化

[0172] 如实施例6.1和6.2所示,分别以1mg/Kg和4mg/Kg的剂量通过尾静脉注射重组人白介素-6(IL-6)(R&D Systems公司)和重组人单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)(R&D Systems公司)到已经构建好的纤维化模型小鼠中(联合组),对照为注射等量重组人白介素-6(IL-6)和与重组人单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)等量的PBS的肝纤维化模型小鼠(对照组)。在注射后的第1周和第2周,处死小鼠并进行SR染色,观察并检测胶原纤维面积。结果表明,在第1周联合组(1.6%)的胶原积累面积显著低于对照组(2.2%),在第2周联合组(1.0%)的胶原纤维面积相比于对照组(1.5%)有明显减少,说明肝纤维化在白介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)联合作用下肝纤维化状况得到了更显著改善。

[0173] 与此同时,发明人按照实施例6.4进行了免疫组织化学检测 α -SMA和TGF- β 1的蛋白表达水平,结果发现,联合组相对于对照组而言 α -SMA和TGF- β 1的表达受到了更明显的抑制。这进一步验证了白介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)的组合在改善或治疗肝纤维化方面的更加优异的作用。

[0174] 实施例15:白介素-6(IL-6)和肝细胞生长因子(HGF)的组合改善小鼠的肝纤维化

[0175] 如实施例6.1和6.2所示,分别以1mg/Kg和1mg/Kg的剂量通过尾静脉注射重组人白介素-6(IL-6)(R&D Systems公司)和重组人HGF蛋白(R&D Systems公司)到已经构建好的纤维化模型小鼠中(联合组),对照为注射等量重组人白介素-6(IL-6)和与重组人HGF蛋白等量的PBS的肝纤维化模型小鼠(对照组)。在注射后的第1周和第2周,处死小鼠并进行SR染色,观察并检测胶原纤维面积。结果表明,在第1周联合组(1.0%)的胶原积累面积显著低于对照组(2.0%),在第2周联合组(0.4%)的胶原纤维面积相比于对照组(1.3%)有明显减少,说明肝纤维化在白介素-6(IL-6)和HGF联合作用下肝纤维化状况得到了更显著改善。

[0176] 与此同时,发明人按照实施例6.4进行了免疫组织化学检测 α -SMA和TGF- β 1的蛋白表达水平,结果发现,联合组相对于对照组而言 α -SMA和TGF- β 1的表达受到了更明显的抑

制。这进一步验证了白介素-6(IL-6)和HGF的组合在改善或治疗肝纤维化方面的更加优异的作用。

[0177] 实施例16:白介素-6(IL-6)和肿瘤生长相关因子(GRO)的组合改善小鼠的肝纤维化

[0178] 如实施例6.1和6.2所示,分别以1mg/Kg和2mg/Kg的剂量通过尾静脉注射重组人白介素-6(IL-6)(R&D Systems公司)和重组人GRO α 蛋白(R&D Systems公司)到已经构建好的纤维化模型小鼠中(联合组),对照为注射等量重组人白介素-6(IL-6)和与重组人GRO蛋白等量的PBS的肝纤维化模型小鼠(对照组)。在注射后的第1周和第2周,处死小鼠并进行SR染色,观察并检测胶原纤维面积。结果表明,在第1周联合组(1.1%)的胶原积累面积显著低于对照组(2.0%),在第2周联合组(0.7%)的胶原纤维面积相比于对照组(1.3%)有明显减少,说明肝纤维化在白介素-6(IL-6)和GRO联合作用下肝纤维化状况得到了更显著改善。

[0179] 与此同时,发明人按照实施例6.4进行了免疫组织化学检测 α -SMA和TGF- β 1的蛋白表达水平,结果发现,联合组相对于对照组而言 α -SMA和TGF- β 1的表达受到了更明显的抑制。这进一步验证了白介素-6(IL-6)和GRO的组合在改善或治疗肝纤维化方面的更加优异的作用。

[0180] 用重组人GRO β 蛋白(R&D Systems公司)和重组人GRO γ 蛋白(R&D Systems公司)分别替换上述的重组人GRO α 蛋白(R&D Systems公司),也均显示出肝纤维化在白介素-6(IL-6)和GRO联合作用下肝纤维化状况得到了更显著改善(其中与重组人GRO β 蛋白的联合下效果最优),以及 α -SMA和TGF- β 1的表达受到了更明显的抑制。

[0181] 这说明了白介素-6(IL-6)和不同形式的重组人GRO蛋白的组合在改善或治疗肝纤维化方面的作用。

[0182] 实施例17:白介素-6(IL-6)和白介素-8(IL-8)的组合改善小鼠的肝纤维化

[0183] 如实施例6.1和6.2所示,分别以1mg/Kg和1.5mg/Kg的剂量通过尾静脉注射重组人白介素-6(IL-6)(R&D Systems公司)和重组人IL-8蛋白(R&D Systems公司)到已经构建好的纤维化模型小鼠中(联合组),对照为注射等量重组人白介素-6(IL-6)和与重组人IL-8蛋白等量的PBS的肝纤维化模型小鼠(对照组)。在注射后的第1周和第2周,处死小鼠并进行SR染色,观察并检测胶原纤维面积。结果表明,在第1周联合组(1.0%)的胶原积累面积显著低于对照组(2.2%),在第2周联合组(0.3%)的胶原纤维面积相比于对照组(1.5%)有明显减少,说明肝纤维化在白介素-6(IL-6)和IL-8联合作用下肝纤维化状况得到了更显著改善。

[0184] 与此同时,发明人按照实施例6.4进行了免疫组织化学检测 α -SMA和TGF- β 1的蛋白表达水平,结果发现,联合组相对于对照组而言 α -SMA和TGF- β 1的表达受到了更明显的抑制。这进一步验证了白介素-6(IL-6)和IL-8的组合在改善或治疗肝纤维化方面的更加优异的作用。

[0185] 虽然用上述实施方式描述了本发明,应当理解的是,在不背离本发明的精神的前提下,本发明可进行进一步的修饰和变动,且这些修饰和变动均属于本发明的保护范围之内。

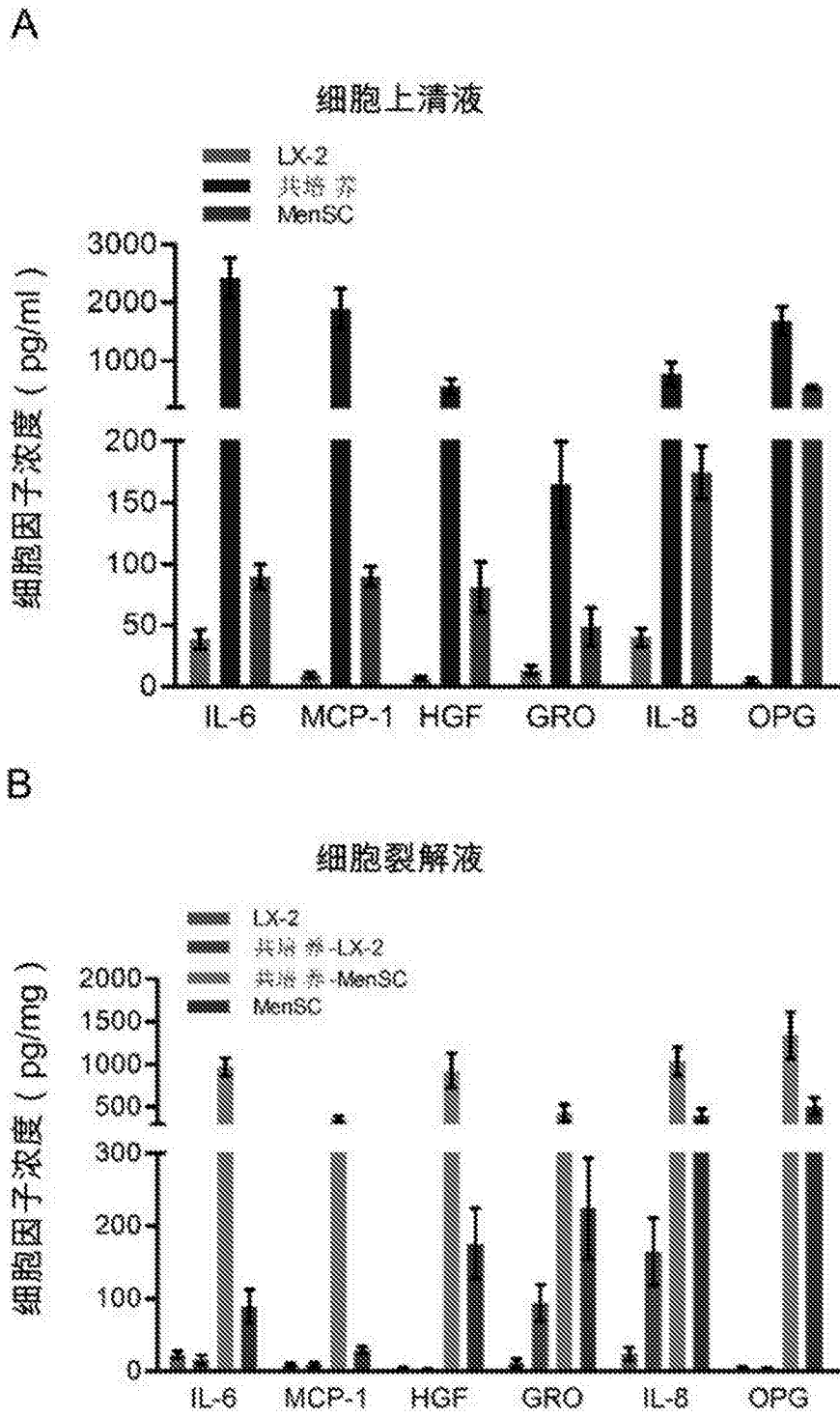


图1